

高数值孔径物镜下 CARS 显微成像光场分布计算

夏元钦 王梓 刘斌 吕昆 成向阳 陈德应 吕志伟

(哈尔滨工业大学可调谐激光技术国家级重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要 为了更好地解释相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)显微成像的基本原理,方便对 CARS 显微图像进行处理,使用角频谱的方法对物镜后的 CARS 显微成像光场分布进行了研究,计算了横向和轴向的光场分布随着物镜数值孔径以及入射光斑大小的变化情况。计算结果表明,光场分布的半峰全宽基本随着数值孔径的增大而减小,并且入射光束腰斑半径越大,CARS 显微成像的分辨率也相对越高。理论计算工作为即将开展的实验奠定了基础。

关键词 成像系统;显微;光场分布;角频谱;相干反斯托克斯拉曼散射

中图分类号 O437 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP48.121801

Calculations of Optical Field Distributions of Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy Using a High Numerical Aperture Objective

Xia Yuanqin Wang Zi Liu Bin Lü Kun Cheng Xiangyang
Chen Deying Lü Zhiwei

(National Key Laboratory of Science and Technology on Tunable Laser, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150080, China)

Abstract In order to better explain the basic principle of coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy and facilitate image processing of CARS micrograph, the method of angular spectrum is proposed to study the optical field distributions of CARS microscopy. Based on this method, lateral and axial optical field distributions as a function of the numerical aperture of objective and the spot size of incident beam are calculated, respectively. Calculations indicate that the full-width at half-maximum (FWHM) of the optical field decreases as the numerical aperture increases, and the bigger the waist radius of incident beam is, the higher the resolution of CARS imaging is. Theoretical calculations lay a solid foundation for the future experiments.

Key words imaging system; microscopy; optical field distribution; angular spectrum; coherent anti-Stokes Raman scattering

OCIS codes 180.4315; 180.5655; 300.2570; 300.6450

1 引言

随着超快激光、脉冲整形技术及激光相干控制理论的发展,人们利用飞秒、皮秒激光作为光源开展了一系列的应用研究,基于超短脉冲的光学显微成像技术就是其中之一^[1~4]。将光学显微镜作为探索微观生物世界的一种重要工具,应用显微成像技术,可以很方便地观测细胞、组织的结构和形态,实时监测细胞内部的变化,测量细胞内蛋白质的分布及定量分析脂类代谢过程^[4,5]。传统的荧光显微成像技术通过注入不同的荧光物质可以实现高灵敏度的选择性成像,但利用荧光染料进行标记往往会对生物样本造成一定的伤害,并且对成像结果也会造成一定的干扰。自发拉曼散射显微成像技术无需使用有毒的荧光物质进行标记,但其

收稿日期: 2011-07-21; **收到修改稿日期**: 2011-08-07; **网络出版日期**: 2011-10-13

基金项目: 国家自然科学基金(60878018)和中央高校基本科研业务费专项资金(HIT. KLOF. 2010033)资助课题。

作者简介: 夏元钦(1968—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事超短脉冲激光技术及应用、超快激光光谱、强场物理等方面的研究。E-mail: xiayuanqin@hit.edu.cn

效率较低,很难实现高灵敏度的探测。而相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)具有相干特性,作为一种非标记性显微成像技术,其灵敏度要远高于自发拉曼散射成像技术。因此,CARS显微成像技术也是近年来人们研究的热点之一。

CARS是一种与分子内部能级相关的三阶非线性过程。频率为 ω_1 和 ω_2 的两束激光入射到样本上发生非线性效应,产生频率为 $2\omega_1 - \omega_2$ 的CARS信号,并且信号强度取决于三阶非线性极化率 $\chi^{(3)}$ 。通过调节两束入射激光的频率,使其频率差与分子内部某振动能级间隔相等,此时 $\chi^{(3)}$ 满足共振条件,CARS信号会大大增强,产生具有类似激光特性的相干信号^[6]。CARS的这种特性使其可以对样本中的某种分子或者某个振动能级进行选择性的、非损伤性探测。CARS显微成像技术最早是在1982年由Duncan等^[7]提出,他们利用CARS显微镜对洋葱表皮细胞成像,不过当时激光器水平不高并且采用的是非共线松聚焦的配置,导致显微成像的空间分辨率与灵敏度都比较低。1999年,Zumbusch等^[8]提出了一种全新的紧聚焦共线相位匹配配置,大大提高了CARS显微成像的灵敏度和空间分辨率,并使其具备了三维(3D)成像能力。此后,CARS显微成像技术获得了突飞猛进的发展,并且正朝着更快的成像速度、更高的灵敏度和多组分探测能力等方向发展^[9-11]。

CARS显微成像的基本过程就是将共线入射的抽运光和斯托克斯光通过高数值孔径的物镜会聚到样本之上,使用探测器探测焦点处CARS信号强度,然后通过扫描激光或者移动平移台测量其他位置的CARS信号,最终利用电脑处理得到整个扫描区域的显微图像。由于物镜的衍射效应以及样本内部的散射,导致电脑得到的图像与实际样本之间会存在一定的误差。为了减小误差,可以采用类似去卷积的方式还原得到更为准确的显微图像。但在此之前,需要对物镜后的激发光场分布以及CARS光场分布进行一定的研究。本文采用角频谱分解的方法对物镜后的激发光场分布进行计算,将物镜入瞳前的光场按入射角进行分解,利用Wolf等^[12,13]提出的高数值孔径系统的衍射理论,计算出不同角频谱在焦点处的分布,然后通过积分,得到物镜后聚焦光场的分布。通过改变数值孔径以及入射激光腰斑半径大小,得到了聚焦光场分布与它们之间的关系。

2 高数值孔径物镜后的激发光场分布

2.1 高数值孔径物镜后光场分布公式

根据瑞利判据,显微镜的极限分辨率取决于物镜的数值孔径大小,显微物镜可以分辨的最小距离为 $0.61\lambda/NA$ (λ 为光波长, NA 为数值孔径)。因此,为了提高分辨率,CARS显微系统需要采用具有较高数值孔径的显微物镜。对于数值孔径较小的情况($NA < 0.3$),可以采用傍轴近似法来计算物镜后的光场分布。然而,对于数值孔径较高的情况,由于光线经过物镜后很快就会聚到了一起,会聚角很大,不再满足傍轴近似中的小角度近似条件;此外电磁场的向量本质也变得十分重要,在傍轴近似中可以直接将光场近似为一个标量场进行计算,在高数值孔径情况下,需要对每一个偏振成分进行计算。因此,在高数值孔径情况下,不再采用傍轴近似法计算物镜之后的光场分布。本文采用角频谱分解的方法求解高数值孔径物镜后的光场分布问题。

在CARS显微成像实验中,根据文献^[4],激发光场可以写为(只考虑抽运光,斯托克斯光求解方法类似)

$$E_p(r, z, t) = E_p(r, z) \exp(-i\omega_p t) + c. c., \quad (1)$$

式中 r 为入射光场相对于光轴的径向距离。假设入射光束为高斯光束,对于一般的高斯光束, $E_p(r, z)$ 大小为

$$E_p(r, z) = E_0 \frac{w_0}{w(z)} \exp\left[-\frac{r^2}{w^2(z)}\right] \exp\left\{-i\left[k\left(z + \frac{r^2}{2R(z)}\right) - \varphi(z)\right]\right\}. \quad (2)$$

在实际实验中,通过使用扩束镜,使激发光入射到透镜之前为近乎平行光,此时可以近似认为 $w(z) = w_0$,因而可以将 $E_p(r, z)$ 改写为

$$E_p(r, z) = E_0 \exp\left(-\frac{r^2}{w_0^2}\right) \exp\left\{-i\left[k\left(z + \frac{r^2}{2R(z)}\right) - \varphi(z)\right]\right\}. \quad (3)$$

假设入射激光偏振方向为 x ,光束的传播方向为 z ,通过一个焦距为 f 的物镜会聚到样本上。图1为激发

光通过高数值孔径物镜后的紧聚焦情形,其中下面的虚线为光学系统的入瞳,也就是显微镜的物镜; w_0 为入射高斯光束的束腰半径; α 为激发光经过物镜后会聚到焦点位置的会聚角,其最大值由物镜的数值孔径决定,为 $\alpha_{\max} = \arcsin(NA/n)$,其中 n 为物镜与样本之间介质的折射率。

由于入射光束为高斯光束,可以将入射的高斯光场表述为另外一种形式,也就是入射光场在角频域上的表达式:

$$E^{\text{inc}}(\alpha) = E_0^{\text{inc}} \exp(-f^2 \sin^2 \alpha / w_0^2). \quad (4)$$

因此,在焦点附近区域的光场用柱坐标可以表示为

$$E(\rho, \varphi, z) = \frac{ikf \exp(-ikf)}{2} \begin{bmatrix} I_{00} + I_{02} \cos 2\varphi \\ I_{02} \sin 2\varphi \\ -i2I_{01} \cos \varphi \end{bmatrix}, \quad (5)$$

式中矩阵的三行分别代表 x, y, z 三个偏振方向的强度,其中 I_{0m} 的表达式为

$$I_{0m} = \int_0^{\alpha_{\max}} E^{\text{inc}}(\alpha) \sin \alpha \sqrt{\cos \alpha} g_m(\alpha) J_m(k\rho \sin \alpha) \exp(ikz \cos \alpha) d\alpha, \quad (6)$$

式中 $g_m(\alpha)$ 在 $m = 0, 1, 2$ 时分别等于 $1 + \cos \alpha, \sin \alpha$ 和 $1 - \cos \alpha$; J_m 是 m 阶贝塞尔函数。

2.2 焦点附近光场各偏振方向的强度

由(5)式可知,焦点附近的聚焦光场 $E(\rho, \varphi, z)$ 是一个三行一列的向量,分别代表了其在 x, y, z 三个偏振方向的电场强度。假设显微物镜的数值孔径为 $NA=0.95$,并假设 $f^2/w_0^2=1$,代入公式求解得到当方向角分别为 $0, \pi/6, \pi/4$ 和 $\pi/3$ 时,聚焦光场各个偏振方向的光强在焦平面上随着距焦点距离 ρ 的变化情况,如图 2 所示。

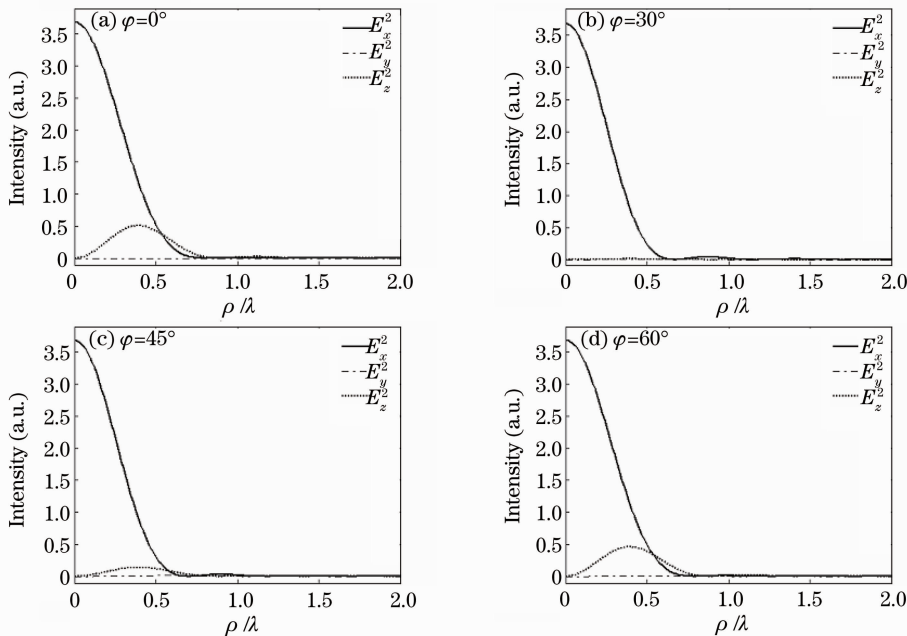


图 2 焦平面上 x, y, z 偏振方向强度随方向角的变化情况

Fig. 2 Intensities of x, y, z polarization directions in the focal plane with different direction angles

由图 2 可以看出,在方向角为 0 时, $\frac{\max(E_x^2)}{\max(E_z^2)} \approx 8, E_y^2 = 0$,而在方向角为 $\pi/6, \pi/4, \pi/3$ 时, $\frac{\max(E_x^2)}{\max(E_z^2)}$ 与 $\frac{\max(E_x^2)}{\max(E_y^2)}$ 都远大于 1,并且焦点中心处 y, z 偏振方向电场强度均为 0。此外,通过计算还发现,方向角 $0, \pi/6,$

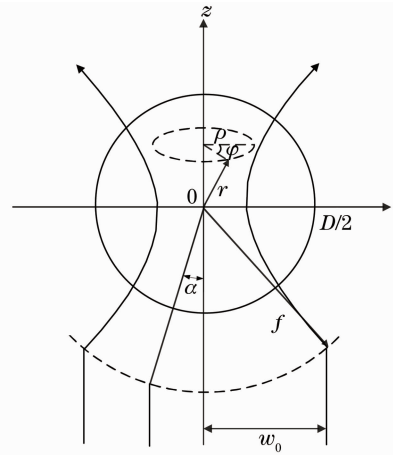


图 1 入射高斯光束紧聚焦情形

Fig. 1 Illustration of the tight focusing of incident Gaussian beam

$\pi/4$ 和 $\pi/3$ 所对应的焦点附近 z 轴方向 y, z 偏振方向电场强度均为 0, 所以, 在相应的计算中只考虑沿 x 方向偏振的成分即可。

2.3 物镜后光场分布随数值孔径的变化情况

数值孔径 $NA = n \sin \mu$ (n 为物镜与样本之间介质的折射率, μ 为物镜可以收集光的最大角度范围的一半) 是显微物镜的一个重要参数, 它决定了物镜的分辨率。普通物镜数值孔径最大可以达到 0.95。为了进一步提高物镜的数值孔径, 人们又发明了水镜、油镜和硅镜等, 这种物镜在物面端的镜片上滴上水、油或者放置硅等折射率大于 1 的物质, 通过提高折射率来提高数值孔径。现在物镜的数值孔径最高已经达到 1.65。本文主要针对普通物镜进行计算。

下面具体分析在不同数值孔径下物镜后的光场分布情况。图 3 为物镜数值孔径分别等于 0.4, 0.6, 0.8 和 0.95 时, 焦平面上方向角为 0 的光场在横向的分布, 为了方便比较, 对最终的场强进行了归一化处理。

从图 3 可以发现, 随着物镜数值孔径的逐渐增大, 聚焦光强在横向上的分布也更为集中。由于成像的原理是将激光束聚焦在样本上, 通过探测样本在聚焦光场作用下产生的 CARS 信号来得到样品的信息, 所以聚焦光场分布越集中, 得到的图像分辨率也就越高。因此, 在实验中需要尽量采用较大数值孔径的物镜。

图 4 为聚焦光场横向分布的半峰全宽 (FWHM) 随数值孔径变化的关系曲线, 可以看出横向光场分布的半峰全宽随着物镜数值孔径的增大逐渐减小。

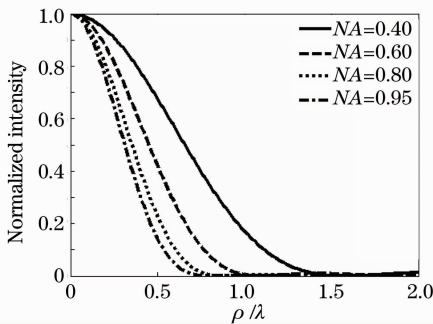


图 3 不同数值孔径物镜焦平面上横向场强分布

Fig. 3 Lateral intensity distributions in the focal plane with different numerical apertures of objective

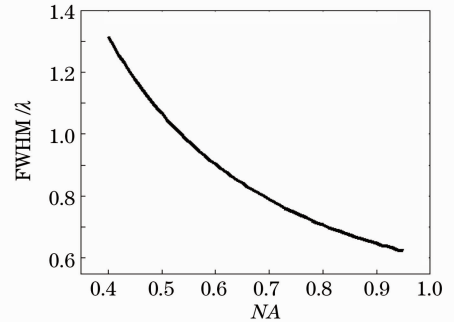


图 4 焦平面上横向光场分布的半峰全宽随数值孔径的变化情况

Fig. 4 FWHM of lateral intensity distribution in the focal plane as a function of numerical aperture

在研究完焦平面上的光场分布后, 开始分析焦点附近轴向光场分布随数值孔径的变化情况, 此时令 $\rho = 0, \varphi = 0$, 将不同的 NA 代入到方程中即可得到相应的场分布。图 5 为 NA 分别为 0.4, 0.6, 0.8 和 0.95 时轴向光场的分布。

从图 5 可以看出, 在焦点附近轴向上的光场分布也随着数值孔径的增大而变得更加集中, 但轴向光场的分布没有横向光场集中, 因而显微镜轴向上的分辨率一般要略低于横向。此外, 横向光场强度随着与光轴距

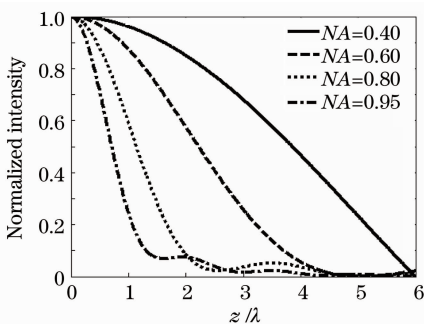


图 5 不同数值孔径物镜焦点附近轴向场强分布

Fig. 5 Axial intensity distributions in the focal region with different numerical apertures of objective

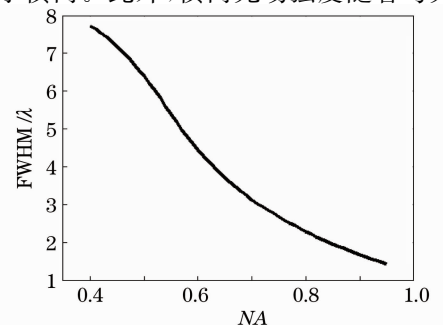


图 6 焦点附近轴向光场分布的半峰全宽随数值孔径的变化情况

Fig. 6 FWHM of axial intensity distribution in the focal region as a function of numerical aperture

离的增大单调递减,而在轴向上光场随着与焦平面距离的增大会呈现一种波动,并且随着数值孔径的提高,这种波动变得越来越明显,这也会对显微镜的轴向分辨率产生一定的影响。

图6为焦点附近轴向光场分布的半峰全宽随数值孔径的变化情况。从图中可以看出,轴向光场的分布也是总体随着数值孔径的提高而逐渐集中的,但是与横向分布相比,轴向光场分布的半峰全宽在数值上要大很多,这也说明了轴向光场的分布没有横向光场集中。

2.4 物镜后光场分布与入射高斯光束腰斑半径的关系

在上面的计算中,为了简便均假设入射到显微物镜上的高斯光束束腰半径与显微物镜的焦距大小相等。而经过理论推导发现,入射光束的腰斑半径也会对聚焦光场的分布产生影响。图7,8分别为 $NA=0.95$,高斯光束束腰半径分别取值使其满足 f^2/w_0^2 为0.1,1,2,4和8时,聚焦光场在焦平面上和在轴向上的分布。为了分析简便,对每种情况的光强都做了归一化处理。

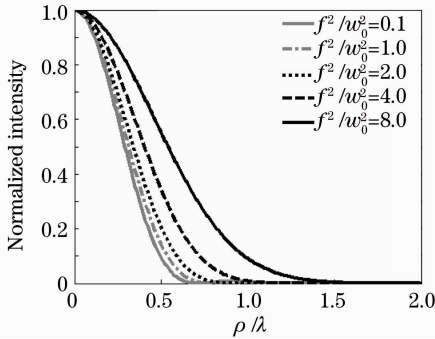


图7 不同束腰半径入射高斯光束焦平面上横向场强的分布

Fig. 7 Lateral intensity distributions in the focal plane with different waist radii of incident Gaussian beam

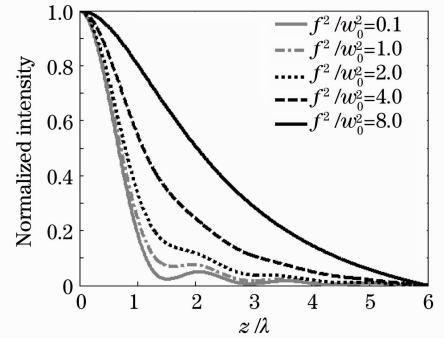


图8 不同束腰半径入射高斯光束焦点附近轴向场强的分布

Fig. 8 Axial intensity distributions in the focal region with different waist radii of incident Gaussian beam

从图7,8可以看出,无论是在轴向还是在横向,随着入射高斯光束的束腰半径逐渐增大,光场分布都更为集中。因此为了提高显微镜的分辨率,需要调节入射到物镜上的光束,在满足功率密度的前提下,尽量增大其光斑面积。

3 高数值孔径物镜后的 CARS 光场分布

CARS 信号光强正比于入射抽运光强度的平方,正比于斯托克斯光强度。为了便于计算焦点附近各点的 CARS 光强,假设斯托克斯光波长为抽运光波长的 1.1 倍。图9,10分别为 $NA=0.95$, $f^2/w_0^2=0.1$ 时,横向和轴向上的单光子荧光和 CARS 光强分布图。为了方便比较,同样对光强进行了归一化处理。

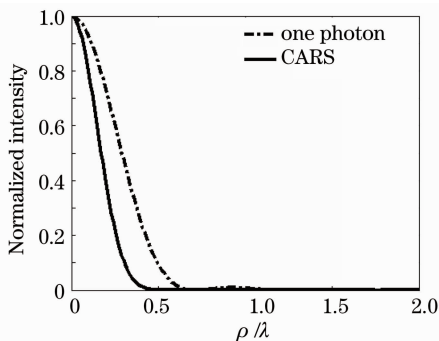


图9 焦平面上单光子荧光和 CARS 横向场强分布
Fig. 9 Lateral intensity distributions of one-photon excitation fluorescence and CARS in the focal plane

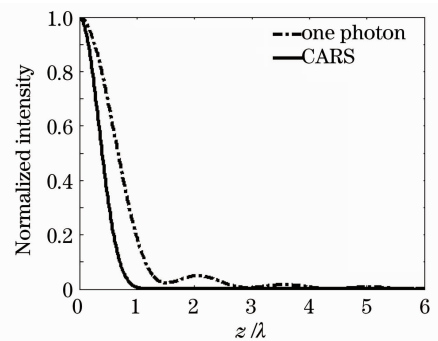


图10 焦点附近单光子荧光和 CARS 轴向场强分布
Fig. 10 Axial intensity distributions of one-photon excitation fluorescence and CARS in the focal region

从图9,10可以看出,无论是在横向还是在轴向,CARS 信号的分布都比激发光也就是比单光子荧光更为集中,也就是说,CARS 显微成像技术的分辨率要高于传统的单光子荧光显微镜。这主要是由于与单光子

荧光相比,CARS过程具有更高的非线性阶次。此外,经计算发现图9中CARS光场分布的半峰全宽约为 0.34λ ,比理论的衍射极限 $0.61\lambda/NA=0.64\lambda$ 还要小,这说明使用CARS显微镜可以实现超越衍射极限的探测。

4 结 论

使用角频谱分解的方法求解了高数值孔径物镜后的光场分布问题。通过研究发现聚焦光场的分布无论是在横向上还是在轴向上均随着物镜数值孔径的增大而变得更加集中。根据CARS显微成像的探测原理可知,为了提高CARS显微镜的分辨率,需要选择数值孔径尽量大的显微物镜。由光场分布公式可知,聚焦光场在横向上的分布要比在轴向上更加集中,且轴向光场分布有一定的波动,所以CARS显微镜在横向上的分辨率要优于在轴向上的分辨率。此外,在相同数值孔径情况下,随着入射高斯光束束腰的增大,聚焦光场的分布更为集中。因此,实验中应该在满足功率密度的前提下尽可能地增大入射高斯光束的束腰半径。

参 考 文 献

- Hou Wenbo, Zhang Mingchang, Lu Peixiang *et al.*. Experimental study of femtosecond laser-assisted deep lamellar cut in rabbit corneas[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2670~2675
侯文博, 张明昌, 陆培祥等. 飞秒激光辅助的兔眼角膜深板层切削的实验研究[J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2670~2675
- H. He, S. K. Kong, R. K. Y. Lee *et al.*. Targeted photoporation and transfection in human HepG2 cells by a fiber femtosecond laser at 1554 nm[J]. *Opt. Lett.*, 2008, **33**(24): 2961~2963
- Rao Yunjiang, Deng Ming, Zhu Tao. Visibility-enhanced in-line Fabry-Pérot interferometers by the use of femtosecond lasers [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(6): 1459~1462
饶云江, 邓明, 朱涛. 飞秒激光加工的高对比度法布里-珀罗干涉传感器[J]. *中国激光*, 2009, **36**(6): 1459~1462
- J. X. Cheng, A. Volkmer, X. S. Xie. Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. *J. Opt. Soc. Am. B*, 2002, **19**(6): 1363~1375
- T. T. Le, H. M. Duren, M. N. Slipchenko *et al.*. Label-free quantitative analysis of lipid metabolism in living *Caenorhabditis elegans* [J]. *J. Lipid Research*, 2010, **51**(3): 672~677
- Yin Jun, Lin Ziyang, Qu Junle *et al.*. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopic imaging technique[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2477~2484
尹君, 林子扬, 屈军乐等. 相干反斯托克斯拉曼散射显微成像技术[J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2477~2484
- M. D. Duncan, J. Reintjes, T. J. Manuccia. Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope[J]. *Opt. Lett.*, 1982, **7**(8): 350~352
- A. Zumbusch, G. R. Holtom, X. S. Xie. Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 1999, **82**(20): 4142~4145
- A. Volkmer. Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2005, **38**(5): R59~R81
- Y. Jung, H. Chen, L. Tong *et al.*. Imaging gold nanorods by plasmon-resonance-enhanced four wave mixing[J]. *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**(7): 2657~2663
- C. L. Evans, E. O. Potma, M. Puoris'haag *et al.*. Chemical imaging of tissue *in vivo* with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy[J]. *PNAS*, 2005, **102**(46): 16807~16812
- E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems. I. an integral representation of the image field[J]. *Proc. R. Soc. Lon. A*, 1959, **253**(1274): 349~357
- B. Richards, E. Wolf. Electromagnetic diffraction in optical systems. II. structure of the image field in an aplanatic system [J]. *Proc. R. Soc. Lon. A*, 1959, **253**(1274): 358~379